

AL



(11) **EP 0 941 318 B9**

(12) **KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**
Hinweis: Bibliographie entspricht dem neuesten Stand

(15) Korrekturinformation:
Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)
Korrekturen, siehe Seite(n) 4, 10

(51) Int Cl.7: **C12N 15/11, C12N 15/89,**
A61K 48/00

(48) Corrigendum ausgegeben am:
19.12.2001 Patentblatt 2001/51

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE97/02704

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
17.01.2001 Patentblatt 2001/03

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 98/21322 (22.05.1998 Gazette 1998/20)

(21) Anmeldenummer: **97949949.8**

(22) Anmeldetag: **13.11.1997**

(54) **HANTELFÖRMIGE EXPRESSIONSKONSTRUKTE FÜR DIE GENTHERAPIE**
DUMBBELL EXPRESSION CONSTRUCTS FOR GENE THERAPY
CONSTRUCTIONS DE STRUCTURES EN HALTERE POUR EXPRESSION EN THERAPIE
GENIQUE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

(30) Priorität: **13.11.1996 DE 19648625**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
15.09.1999 Patentblatt 1999/37

(73) Patentinhaber: **Soft Gene GmbH**
14195 Berlin (DE)

(72) Erfinder:
• **WITTIG, Burghardt**
D-14197 Berlin (DE)
• **JUNGHANS, Claas**
D-10587 Berlin (DE)

(74) Vertreter: **Omsels, Hermann-Josef et al**
HERTIN Anwaltssozietät Kurfürstendamm 54/55
10707 Berlin (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 686 697 **WO-A-96/32473**

EP 0 941 318 B9

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Design-Prinzip für ein minimales Expressionskonstrukt, welches neben Promotor- und Terminationssequenzen, die zur Steuerung der Expression notwendig sind, keine andere genetische Information enthält als die zu exprimierende. Derartige minimale Expressionskonstrukte sollen für molekularmedizinische Anwendungen eingesetzt werden, insbesondere die genetische Vakzination, Onkotherapie und -Prophylaxe.

[0002] Das Design-Prinzip soll zur Konstruktion von Expressionskonstrukten für die Expression von MHC-I oder MHC-II präsentierbaren Peptiden, Cytokinen oder Komponenten der Regulation des Zellzyklus, oder zur Synthese regulativer RNA-Moleküle wie antisense-RNA, Ribozymen oder mRNA-editierende-RNA eingesetzt werden. Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist es zudem, daß das Konstruktionsprinzip die kovalente Verknüpfung des Expressionskonstrukts erlaubt, so zum Beispiel mit Peptiden, Proteinen, Kohlenhydrat- oder Glycopeptidliganden, sowie Partikeln, die zum ballistischen Transfer zum Einbringen der Konstrukte in die Zellen, insbesondere der Dermis, des Muskelgewebes, des Pankreas und der Leber benutzt werden können.

[0003] Die Erfindung soll insbesondere für zwei eng miteinander verwandte Gebiete benutzt werden: somatische Gentherapie und genetische Vakzinierung. In der Immuno-Gentherapie onkologischer Erkrankungen berühren sich diese Gebiete. Während bei der "klassischen" Gentherapie fehlende oder fehlerhafte Gene ersetzt werden sollen, soll bei der immuno-therapeutischen Gentherapie das Immunsystem des Patienten gegen tumorspezifische Antigene aktiviert werden. Beim malignem Melanom und einigen anderen Tumoren konnte eine Reihe von tumorspezifischen Antigenen identifiziert werden, die durch cytotoxische T-Lymphocyten erkannt werden (Van den Eynde B. and Brichard V. G., Current Opinion in Immunology (1995) 7: 674-681). In den meisten Fällen handelt es sich um Fragmente mutierter Proteine, die entweder für die Tumorentwicklung und Promotion relevant sind (Stüber et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 765-768), oder um Fragmente von Proteinen aus dem veränderten Stoffwechsel der Tumorzelle. Im Fall des Melanoms entstammen die präsentierten Peptide häufig Proteinen aus der Melanocyten-spezifischen Differenzierung. Für Ansätze, die sich der Aktivierung des Immunsystems gegen solche tumorspezifischen Antigene bedienen, sind Methoden wichtig, die genannten antigenen Epitope auch in nicht-Tumorzellen wie antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) zu überexprimieren. Alternativ sind auch Gene, die die Expression Peptid-präsentierender Proteine steuern, wie CIITA oder IC-SBP, von großer Bedeutung.

[0004] Laborexperimente und klinische Studien, in denen solche Peptide für die Induktion oder Verstärkung einer tumorspezifischen cytotoxischen Antwort einge-

setzt wurden, konzentrieren sich auf konventionelle Vakzinationsprotokolle, bei denen die jeweiligen Peptide eingesetzt wurden (Strominger J., Nature Medicine, (1995) 1: 1.179 - 1.183). Alternativ wurden Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, mit hohen Konzentrationen solcher Peptide inkubiert. Dadurch werden die ursprünglich durch den MHC-Komplex präsentierten Peptide gegen die tumorspezifischen Peptide ausgetauscht (Grabbe et al., Immunology Today (1995) 16:117-121).

[0005] Der Begriff der genetischen Vakzinierung (Immunisierung) beschreibt die Nutzung eines experimentellen Befundes, der zunächst als Artefakt wissenschaftlich umstritten war, seit kurzer Zeit aber für eine Vielzahl von biomedizinischen Fragestellungen bestätigt werden konnte (Piatak et al., Science 259 (1993): 1745 - 1749). Injiziert man ein Expressionsplasmid für Säugerkzellen in Haut- oder Muskelschichten, so kommt es, wenn auch in sehr geringer Effizienz, in den Zellen dicht an der Injektionsstelle zur Expression des entsprechenden Gens. Handelt es sich bei dem Expressionsprodukt um ein Fremdprotein (xenogenes oder allogenisches Protein), kommt es, wahrscheinlich im Laufe einer lokalen Entzündung, zur Aufnahme und Präsentation von Fragmenten des exprimierten Proteins (Oligopeptide) durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Je nach lokaler Cytokin-Situation und in Abhängigkeit davon, in welchen Zellen das Plasmid exprimiert wird (Präsentation über MHC-I oder MHC-II), kommt es zur Auslösung einer Immunreaktion auf dem T_{H1} oder T_{H2} Weg (Wang et al., Human Gene Therapy 6 (1995): 407 - 418), die letztlich jeweils zur Proliferation cytotoxischer T-Zellen oder zur Produktion löslicher Antikörper führen. Die Transfektion von dendritischen Zellen mit Expressionskonstrukten für antigene Peptide *ex vivo* wird in diesem Zusammenhang hier ebenfalls als genetische Vakzinierung bezeichnet.

[0006] Eine solche genetische Vakzinierung vermeidet die vielfältigen Risiken herkömmlicher Immunisierungsverfahren. Es sind zahlreiche Ansätze in der Gentherapie bekannt, durch das Einbringen von Erbinformation in Zellen therapeutische oder prophylaktische Wirkungen zu erzielen. Diese Ansätze sind nicht nur im Tierversuch, sondern auch in zahlreichen klinischen Studien an Patienten demonstriert worden, so beispielsweise das sog. ballistomagnetische Vektorsystem (EP 0 686 697 A2) für die Transfektion mit herkömmlichen, plasmidbasierten Expressionskonstrukten. Das ballistomagnetische Vektorsystem wurde durch die hiesige Anmelderin/Erfinder in drei klinischen Phase-I/II Studien für die Produktion Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-12 (IL-12) oder Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) überexprimierender Tumorzellen eingesetzt. Im Fall der Expression von IL-12 wurden separate Expressionskonstrukte für die Gene der beiden IL-12 Untereinheiten gleichzeitig ballistomagnetisch transfiziert (Schadendorf et al., Molecular Medicine Today 2 (1996): 144-145).

[0007] Mit dem Fortschreiten dieser neuen Disziplin muss allerdings der bisherige Methodenkatalog der Gentherapie kritisch untersucht werden. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei die auf den bisher verwendeten DNA-Konstrukten enthaltene Sequenzinformation. Solen Expressionskonstrukte an großen Patientenzahlen, und möglicherweise mehrmals, angewendet werden, so werden Sicherheitsaspekte besonders in immunologischer Hinsicht stark an Gewicht gewinnen. Die bisher angewendeten Expressionskonstrukte sind Weiterentwicklungen eukaryoter Expressionsplasmide. Diese weisen zwei fundamentale Nachteile auf: Ihre Größe, die einen schnellen Transport in den Zellkern behindert, und die Anwesenheit von für die eigentliche Anwendung nicht benötigten Sequenzen. Bisher verwendete Expressionskonstrukte tragen konstitutiv exprimierte Gene z.B. für Cytostatikaresistenzen, die als Selektionsmarker fungieren, sowie ggf. Sequenzen, die zur episomalen Replikation in der Zielzelle notwendig sind. Die Expression dieser Gene stellt einen unerwünschten Hintergrund der transfizierten genetischen Information dar. Zudem tragen diese Konstrukte neben der eigentlichen Promotor-Gen-Terminationsstruktur, die zur Expression gebracht werden soll, mindestens die zur bakteriellen Replikation notwendigen Sequenzen, da die Plasmide in Bakterien propagiert werden, die ebenfalls zur eigentlichen Anwendung nicht benötigt werden.

[0008] Es ist offensichtlich, daß die bisherigen Expressionskonstrukte nicht nur zur Expression des eigentlich gewünschten Gens führen, sondern auch zur Biosynthese xenogener Proteine, selbst wenn deren prokaryontische Promotoren sehr niedrige Aktivität in Säugerzellen aufweisen. Bei längerer oder wiederholter Applikation kann davon ausgegangen werden, daß die erwünschte Immunantwort durch solche kontaminierenden Genprodukte maskiert wird und signifikante immunologische Komplikationen entstehen können.

[0009] Eine andere Problematik bei der Anwendung gentherapeutischer Methoden betrifft die Methode, mit der das zu transferierende genetische Material in die Zellen hineingebracht wird. Aus Gründen der Effizienz, immunologischen Sicherheit und breiten Anwendbarkeit über viele Zelltypen ist die Methode des ballistischen Transfers bevorzugt. Ein wesentlicher Vorteil des ballistischen Transfers gegenüber den alternativen Transfektionsmethoden ist, daß die Methode relativ leicht zwischen verschiedenen Zell- oder Gewebetypen übertragbar ist. Die heute vielfach angewendeten Methoden zur Transfektion von eukaryoten Zellen, wie Elektroporation oder Lipofektion, haben zudem den entscheidenden Nachteil, daß die Behandlung die zu transportierende Substanz nur über die Plasmamembran bringt, die erste Barriere, die die Zelle von ihrer Umwelt abgrenzt. Es ist aber für die meisten in die regulatorischen Funktionen der Zelle eingreifenden Substanzen notwendig, aus dem Zytoplasma über die nukleäre Membran in den Zellkern zu gelangen. Diese Membran ist biophysikalisch grundsätzlich verschieden von der

Plasmamembran, und Methoden wie Elektroporation oder Lipofektion überwinden diese Barriere nicht. Der Grund, warum die genannten Methoden dennoch bei einem Teil der Zellen z.B. zur Expression in die Zelle eingebrachter rekombinierter Nukleinsäurekonstrukte führt, ist die Tatsache, daß beim Vorgang der Zellteilung die nukleäre Membran offenbar durchlässig wird. Dies hat zur Konsequenz, daß mit Methoden wie Elektroporation oder Lipofektion nur Zellen transfiziert werden können, die sich teilen. Für viele sich langsam oder gar nicht teilende Zellarten, die im Rahmen möglicher gentherapeutischer Behandlungen interessant sind, wie Stammzellen des Immunsystems oder der Hämatopoiese, Muskelzellen, Zellen exokriner oder endokriner sekretorischer Organe, oder Neuronen und ihre Begleitzellen, kommen deshalb diese Methoden nicht in Frage. Die ebenfalls verbreitete, und in der Transfektionseffizienz sehr erfolgreiche Methode des viralen Transports von Erbmaterial hat den großen Nachteil, die transfizierten Zellen einer möglichen cytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auszusetzen, was sie für gentherapeutische Ansätze nur sehr begrenzt in Frage kommen lassen dürfte.

[0010] Die Methode des ballistischen Transfers hat in der ex vivo Behandlung autologer oder allogener Patientenzellen Anwendung gefunden (Mahvi et. al.; Human Gene Therapy 7 (1996): 1535-43). Bei der Behandlung von Zellen im Zellverband allerdings, wie sie besonders für die onkotherapeutische Behandlung solider Tumore oder der massenhaften Infektionsprophylaxe durch genetische Vakzinierung vorteilhaft wäre, hat der Stand der Technik Nachteile: Die Methode des ballistischen Transfers bedient sich auf die Mikroprojektele adsorbierter DNA. Bei Transfektion von Haut oder anderen Gewebeverbänden ist die Eindringtiefe der DNA-Konstrukte niedriger als die Eindringtiefe der Projektile. Die DNA wird bald nach dem Auftreffen auf das Gewebe abgestreift. Es wird also nur jeweils die oberste, oder die oberen, in Richtung der Geschosßgarbe liegenden Zellschichten transfiziert, obwohl die Mikroprojektele z.T. viel tiefer in das Gewebe eindringen. Beim Transfizieren von solidem Tumorgewebe (Colonkarzinom, Rectumkarzinom, Nierenzellkarzinom und andere) hat man gefunden, daß bei geeigneter Einstellung der Parameter die Mikroprojektele eine Eindringtiefe von bis zu fünf Zellschichten in die Gewebeschnitte erreichen. Die transfizierten Zellen aber (sichtbar als fluoreszierende Zellen bei Transfektion mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt, das das Gen für das grün fluoreszierende Protein aus *Aequorea Victoria* enthält) lagen alle nur in der obersten, der auftreffenden Garbe an Mikroprojekten zugewandten Zellschicht des Gewebeschnitts. Eine festere Kopplung der DNA-Konstrukte an die Oberfläche der Mikroprojektele wäre wünschenswert, um das Abstreifen der zu transportierenden Substanz zu vermeiden. Erst so wird eine Anwendung gentherapeutischer Ansätze bei soliden Tumoren realistisch, da erst die Transfektion von Tumorschnitten in

der Tiefe des Gewebes eine ausreichend hohe Anzahl behandelter Zellen ermöglicht. Gleichzeitig ist vorstellbar, daß eine Kombination verschiedener Kopplungsmethoden eine zeitlich verschobene Freisetzung mehrerer genetischer Informationen innerhalb der gleichen Zellpopulation ermöglicht. Für diese wie zahlreiche weitere Anwendungen wären Mikropartikel, die die zu transportierende Substanz bis in die getroffene Zelle bringen, wo die Substanz dann der Zelle zur Verfügung stünde, sehr wünschenswert.

[0011] Die US 5,584,807 (McCabe) beschreibt ein Instrument in Form einer gasdruckbetriebenen Pistole zum Einbringen von genetischem Material in biologisches Gewebe, wobei Goldpartikel als Trägermaterial für die genetische Information verwendet werden, ohne aber auf das genetische Material im besonderen einzugehen. Die US 5,580,859 und US 5,589,466 (Felgner) beschreibt ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Säugerzellen im Rahmen der Gentherapie. Hierzu werden sogenannte nackte DNA-Sequenzen, die für physiologisch aktive Proteine, Peptide oder Polypeptide kodieren und mit einem Promotor versehen sind, direkt in Zellen injiziert. Die DNA wird in den Zellen exprimiert und dient als Vakzine.

[0012] Die WO 96/26270 (Rhône-Poulenc Rorer S. A.) beschreibt ein zirkuläres, doppelsträngiges (supercoiled) DNA Molekül, welches eine Expressionskassette enthält, kodierend für ein Gen und gesteuert über einen Promotor und einen Terminator. Auch dieses System wird in der Vakzinierung im Rahmen der Gentherapie eingesetzt.

[0013] Die WO 96/32473 betrifft "Hantel-Oligonucleotide als Sense-Inhibitoren des Herpes Simplex Virus (HSV)". Durch diese Erfindung werden hantelförmige kovalent geschlossene Oligonucleotide beschrieben, die eine Bindungsstelle für ICP4-Proteine des Herpes Simplex Virus (HSV) enthalten.

[0014] Die EP 0 686 697 A2 (Soft Gene) betrifft eine Methode zur Anreicherung von Zellen, die durch ballistischen Transfer modifiziert wurden und beschreibt den technologischen Hintergrund und die damit zusammenhängende Problematik und ihre bisher bekannten Lösungen. Primär wird hierin jedoch das grundsätzliche Verfahren des ballistischen Transfers beschrieben. Eine geeignete Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens ist in der EP 0 732 395 A1 beschrieben.

[0015] Bei den ballistischen Partikeln handelt es sich (EP 0 686 697 A2) um Goldpartikel mit einem Durchmesser von entweder 1 µm oder 1,5 µm, die in Abhängigkeit vom Zelltyp ausgewählt werden. Die Goldpartikel sind mit superparamagnetischen Partikeln von ungefähr 30 nm Durchmesser beschichtet. Die superparamagnetischen Partikel stellen gleichzeitig eine geeignete Oberfläche für die Beschichtung mit Biomolekülen zur Verfügung. Die Verwendung von magnetischen Partikeln dient der Sortierung.

[0016] Bekannt sind ferner hantelförmige Nukleinsäurekonstrukte, die sich durch folgende Merkmale aus-

zeichnen: Es handelt sich um kurze (10-50 Basenpaare doppelsträngige DNA) Nukleinsäurekonstrukte, die zur Strukturforschung hergestellt wurden oder als doppelsträngiges, nukleasebeständigeres Oligomer zum Abfangen sequenzspezifischer DNA-Liganden (Clusel et. al.; Nucleic Acids Res. 21 (1993): 3405-11; Lim et. al., Nucleic Acids Res. 25 (1997): 575-81)

[0017] Längere DNA-Moleküle, die zum Teil während ihres Replikationszyklus auch als Hantel vorliegen können, sind aus der Natur als mitochondriale Genome einiger Arten bekannt, so bei Wimperntierchen (*ciliatae*) und Hefen (Dinuel et. al., Molecular and Cell Biology, 13 (1993): 2315-23). Diese Moleküle sind etwa 50 kb groß und haben eine sehr komplexe genetische Struktur. Ebenfalls ist von *Vaccinia*-Virus eine geschlossen kovalente lineare Struktur bekannt.

[0018] Peptid-Nukleinsäureverknüpfungen mit Lokalisationssequenzen sind für kurze DNA-Oligomere bekannt. Morris et. al. (Nucleic Acids Res. 25 (1997): 2730-36) beschreiben die Kopplung von 18-meren bis 36-meren mit einem 27 Aminosäurereste enthaltenden Peptid, welches die Lokalisationssequenz aus SV40 enthält, sowie ein für die Fusion mit CD4-positiven Zellen verantwortliches Signalpeptid aus HIV-gp41.

[0019] Der Gebrauch von Peptidketten zur Überwindung der endosomalen Membran ist von mehreren Gruppen untersucht worden. So wurden die 23 N-terminalen Aminosäuren von Haemagglutinin über nicht-kovalente Wechselwirkungen an Expressionsplasmide adsorbiert, um diese Expressionsplasmide nach endosomaler Aufnahme der Komplexe in das Cytosol zu schleusen (Plank et. al., J. Biol. Chem. (1994) 269: 12918). Die kovalente Verknüpfung von antisense-Desoxyoligonukleotiden mit Haemagglutinin-Peptiden wird von Bongartz et al. (Nuc. Acids Res. (1994) 22: 4681) beschrieben.

[0020] Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Expressionskonstrukt zu entwickeln, welches lediglich die für die Expression notwendige Information enthält und geeignete Mittel für den Transport in eine gentherapeutisch zu behandelnde Zelle zur Verfügung zu stellen.

[0021] Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1 und 13. Erfindungsgemäß werden zu transportierende doppelsträngige Expressionskonstrukte aus Desoxyribonukleinsäure so modifiziert, daß die beiden antiparallelen Stränge des Desoxyribonukleinsäurepolymers, welche die codierende Sequenz sowie die zu ihrer Expression notwendigen Promotor- und gegebenenfalls Terminationssequenzen enthalten, von je einer Schlaufe aus einzelsträngigen Desoxyribonukleotiden an beiden Enden derart kovalent verknüpft werden, daß ein durchgehend kovalent geschlossenes Molekül entsteht. Vorzugsweise ist diese Schlaufe drei bis sieben Nukleotide lang. In Figur 1 ist ein erfindungsgemäßes Konstrukt schematisch dargestellt. Derartige Expressionskonstrukte dienen zur Expression von MHC-I oder MHC-II präsentierbaren Peptiden, Cytoki-

nen oder Komponenten der Regulation des Zellzyklus, oder zur Synthese regulativer RNA-Moleküle wie antisense-RNA, Ribozymen oder mRNA-editierende-RNA. Da die Nukleinsäure auf diese Weise kovalent geschlossen ist und keine freie OH-Enden zum Abbau zur Verfügung stellt, hat das Molekül eine sehr viel höhere Stabilität gegenüber intra- und interzellulären Nukleasen und damit eine längere Halbwertszeit im Körper bzw. der Zelle. Besonders schwer wiegt dieser Vorteil bei der Applikation *in vivo*.

[0022] Weiterhin können sich erfindungsgemäß in der genannten Schlaufe, die die Stränge miteinander verbindet, eine oder mehrere modifizierte Basen befinden, die die chemischen Funktionen enthalten, die die Kopplung mit einer festen Phase ermöglichen, vorzugsweise Amin-, Carbonsäure-, Thiol- oder Disulfidmodifikationen. Diese werden über bekannte Syntheseschritte mit korrespondierenden Carbonsäure-, Aldehyd-, Amin-, Thiol- oder anderen Funktionen oder direkt mit der Goldoberfläche eines Mikroprojektils zum ballistischen Transfer kovalent verbunden. Es ist vorstellbar, daß eine Kombination verschiedener Kopplungsmethoden eine zeitlich verschobene Freisetzung mehrerer genetischer Informationen innerhalb der gleichen Zellpopulation ermöglicht.

[0023] Neben dem Vorteil einer erleichterten chemischen Bindung an die Oberfläche des Mikroprojektils bietet die genannte Nukleinsäurekonstruktion auch einen weiteren Vorteil: Die heute zumeist zur Transfektion in der Gentherapie benutzten Nukleinsäurekonstrukte werden in Bakterien produziert und tragen, neben den im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung relevanten Sequenzen, auch Sequenzen, die allein für die Vermehrung des Nukleinsäurekonstrukts in den Bakterien wichtig sind. Diese Sequenzen stellen ein nicht bekanntes Risiko für den zu behandelnden Patienten dar, da nicht bekannt ist, ob und gegebenenfalls wie sie sich im Organismus auswirken können. Solche Sequenzen, die nicht ausschließlich dem primären Ziel der Transfektion in den Zielzellen dienen, lassen sich vor der Transfektion aus in Bakterien vermehrten Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleaseverdau entfernen und durch kovalente Bindung von kurzen, gegebenenfalls chemisch modifizierten, Endstücken aus Desoxyribonukleinsäure ersetzen. Ebenfalls können erfindungsgemäß die in die Zelle zu transportierenden Desoxyribonukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion mit chemisch modifizierten Primern hergestellt werden, so daß die Produkte der Polymerase-Kettenreaktion die zur Bindung an das Mikroprojektil benötigte chemische Modifikation enthalten. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Konstruktionsprinzips gegenüber herkömmlichen Expressionsvektoren ist es daher, daß das entstehende Konstrukt nur die zur Expression des Zielgens notwendige Sequenz enthält.

[0024] Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist, daß in der genannten Schleife aus einzelsträngigen Desoxyribonukleotiden an beiden Enden des Moleküls chemi-

sche Modifikationen so eingeführt werden können, daß sich nicht-Nukleinsäure-Liganden an das Nukleinsäure-Expressionskonstrukt kovalent koppeln lassen. So lassen sich etwa Peptide, die zur nukleären Lokalisation des Expressionskonstrukts führen, mit dem Konstrukt so verbinden, daß dieses auch nach Eindringen nur in das Cytosol einer Zelle von deren Translokationsapparat in nukleäre Kompartimente gebracht wird, wo das Expressionskonstrukt abgelesen werden kann. Die oben genannten Einschränkungen für manche Transfektionen wären damit aufgehoben. Ebenfalls zugänglich wäre die direkte Kopplung des Konstrukts an Peptid-, Glycopeptid- oder Kohlehydratlignanden, welche das Eindringen des Konstrukts über zellspezifische Oberflächenrezeptoren ermöglichen könnten.

[0025] Insbesondere werden erfindungsgemäß zu transportierende doppelsträngige, antiparallele Expressionskonstrukte aus Desoxyribonukleinsäure so modifiziert, daß sie an den Enden der Doppelstränge je eine Disulfidbrücke enthalten, die die Stränge an beiden Enden über eine am 5'-Ende des einen und am 3'-Ende des anderen Stranges kovalent gebundene Alkylgruppe miteinander verknüpft.

[0026] Als Promotor für die Transkriptionskontrolle des Expressionsplasmids eignet sich prinzipiell jede eukaryote Promotorsequenz. Besonders vorteilhaft sind kurze Promotoren mit hoher Transkriptionsrate, welche in einer Vielzahl von Zellen transkribiert werden können, wie z.B. der "immediate early promotor" aus Cytomegalovirus (CMV-Promotor). Für die Transkription von Genen, welche für RNA kodieren, sind RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren wie der 7SK-Promotor oder der U6-Promotor vorteilhaft. Solche Promotorsequenzen können *in vivo* die Expression kurzer antisense-RNAs, von Ribozymen und artifizieller mRNAs bewirken. RNA-Polymerase III erzeugt weitaus höhere Anzahlen an Kopien von RNA als Polymerase II und hat - was besonders vorteilhaft ist - ein exaktes Terminationsignal. Die genannten Promotorsequenzen zeichnen sich durch ihre Kürze aus, was die entsprechenden Hantel-Expressionskonstrukte klein macht, was wiederum deren Eintritt in den Zellkern bevorteilt.

[0027] Die Erfindung betrifft auch den Transport von Nukleinsäuren in Zellen. Nukleinsäuren werden in Zellen erfindungsgemäß dadurch eingebracht, daß die Nukleinsäuren an die Oberfläche des Mikroprojektils, das die Nukleinsäuren in die Zellen bringt, über Adsorption, kovalente oder ionische Wechselwirkungen so gebunden werden, daß sie beim Durchtreten des Mikroprojektils durch Bindegewebe, die Zellen umgebende Flüssigkeit oder Zellschichten nicht oder nicht vollständig desorbiert werden, sondern an die Mikroprojektil gebunden bleiben, bis sie mit diesen in den Zielzellen zur Ruhe kommen. Dies hat den Vorteil, daß die Substanz dann je nach Bindungsart entweder der Zelle in gebundenem Zustand zur Verfügung steht, oder aber in einem, im Vergleich zur Eintrittszeit in die Zelle langsameren, Prozeß desorbiert wird und in diesem desorbierten Zustand

der Zelle zur Verfügung steht.

[0028] Grundsätzlich ist die Bindung von Thiol- oder Disulfiden an Goldoberflächen gut untersucht und beschrieben (G. M. Whitesides et al., Langmuir 10 (1994): 1825-1831). Die zu transportierenden Nukleinsäuren werden jedoch vorzugsweise an Mikroprojekteile aus Gold gebunden, indem die Nukleinsäuren zuerst durch kovalente Modifikation mit handelsüblichen Reagenzien mit Thiol- oder Disulfidgruppen ausgestattet werden, und dann über die Thiol- oder Disulfidgruppen adsorbiert, oder durch anodische Oxidation der Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Gold-Mikroprojektils als Anode kovalent an das Mikroprojektil gebunden werden. Insbesondere wird erfindungsgemäß die zu transportierende Substanz durch Verknüpfung über Schwefel-Gold-Bindungen oder Disulfidbindungen an das Mikroprojektil gebunden. Bei Verwendung von Mikroprojekten aus Gold wird die zu transportierende Substanz, wenn sie von sich aus keine Thiol- oder Disulfidgruppen, die bindungsfähig waren, enthält, durch kovalente Verknüpfung mit Thiolgruppen oder Disulfidbrücken enthaltenen Molekülen modifiziert. Sie wird dann durch Chemisorption an die Goldoberfläche des Mikroprojektils gebunden. Die entstehende Gold-Schwefelbindung ist stark genug, das zu transportierende Molekül auch durch mehrere Zellschichten hindurch mitzureißen.

[0029] Da in der Zelle Moleküle vorhanden sind, die Thiolgruppen aufweisen, vor allem das ubiquitäre Glutathion, kommt es in einer Gleichgewichtsreaktion der Thiolgruppen an der Goldoberfläche zu einer langsamen Desorption des chemisorbierten Moleküls von der Oberfläche des Mikroprojektils. Somit steht die transportierte Substanz der Zelle nach der Desorption frei zur Verfügung. Weiterhin kann erfindungsgemäß bei Verwendung von Mikroprojekten aus Gold das zu transportierende Molekül, das Thiol- oder Disulfidbrücken aufweist, durch anodische Oxidation der Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Gold-Mikroprojektils als Anode kovalent an das Mikroprojektil gebunden werden.

[0030] Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, daß bei Verwendung von Mikroprojekten aus oxidischer Keramik, Glaskeramik oder Glas das zu transportierende Molekül über Ester-, Amid-, Aldimin-, Ketal-, Acetal- oder Etherbindungen oder sonstige Funktionalitäten, die dem organischen Chemiker zur Bindung von Molekülen an feste Oberflächen bekannt sind, gebunden werden. Die zahlreichen zur Modifikation von Silicium-oxidphasen zur Verfügung stehenden Silanreagenzien bieten sich hier an.

[0031] Die Erfindung dient dem Einsatz in der *ex vivo* Gentherapie. Bevorzugt werden Interleukin-7 (IL-7) und Interleukin-12 (IL-12) Proteine oder deren Untereinheiten exprimiert, sowie Interleukine, Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Oberflächenantigene und Liganden immunkontrollierender oder-stimulierender Lymphozytenantigene wie CD40,

B7-1 und B7-2, Proteine des MHC-Komplexes I oder II sowie beta-2 Mikroglobulin, Interferon-Konsensussequenz-bindendes Protein ICSBP, CIITA, Flt3 sowie ganze Proteine oder Fragmente dieser von präsentierbaren Epitopen aus tumorspezifisch exprimierten mutierten oder nichtmutierten Proteinen wie Ki-RAS-Fragmente, p16 und p53, oder bcr-abl Produkt. Bevorzugt ist zum einen der Einsatz von Mikropartikeln, die alle mit demselben Konstrukt markiert sind, zum anderen aber auch Cocktails (Mischungen) aus Mikroprojekten, die mit unterschiedlichen Konstrukten verknüpft sind, das heißt mit Konstrukten, die für unterschiedliche Expressionskonstrukte kodieren, oder aber auch Cocktails aus Mikroprojekten, die jeweils mit mehreren, ggf. unterschiedlichen Konstrukten verknüpft sind.

[0032] Das erfindungsgemäße Desoxyribonukleinsäurekonstrukt dient bevorzugt auch als Impfstoff zur Behandlung von Infektionskrankheiten an Mensch und Tier, beispielsweise Malaria und Grippe.

[0033] Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung ist in den anliegenden Zeichnungen dargestellt und wird nachfolgend anhand von Beispielen näher beschrieben. Es zeigt:

Figur 1 eine schematische Darstellung des Konstrukt-konzeptes, worin Fig. 1.1 den Aufbau der kovalent geschlossenen Phosphat-Zuckerkette zeigt; die dargestellte Zahl an Basenpaaren entspricht nicht notwendigerweise der Länge der Konstrukte, sondern dient nur der prinzipiellen Verdeutlichung; Fig. 1.2 zeigt den funktionellen Aufbau eines von mehreren möglichen Expressionskonstrukten;

Figur 2 zeigt den schematischen Ablauf der Konstrukt-darstellung.

Beispiel 1 [Synthese der Expressionskonstrukte]:

[0034] Das grundlegende Konstruktionsprinzip wird in Fig. 2 schematisch wiedergegeben und sieht wie folgt aus:

1.1 Synthese aus Vektor:

[0035] Das zu exprimierende Gen, z.B. Granulozyten-Makrophagenstimulierender Faktor gm-csf, wird aus cDNA mittels geeigneter Primer mittels PCR amplifiziert (Fig. 2 (1)) und in einen geeigneten Plasmidvektor rekombiniert (Fig. 2 (2)). Nach Sequenzierung und Bestätigung der Zielsequenz wird die zu exprimierende Sequenz aus dem genannten Plasmidvektor mittels zweier Primer (Oligodesoxynukleotide, welche an der 5'-Seite ihrer Sequenz Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen tragen) amplifiziert (Fig. 2 (3)). Das entstehende Amplifikationsprodukt wird mit den ge-

nannten Endonukleasen, für welche eine Erkennungssequenz auf den genannten Primern vorhanden war, verdaut. Nach Isolierung des amplifizierten Fragments aus Agarosegel wird dieses in ein Expressionsplasmid rekombiniert, welches in Bakterien vermehrbar ist, und in welchem das zu exprimierende Gen in der gewünschten Orientierung im Kontext der auf dem Expressionsplasmid befindlichen expressionssteuernden Sequenzen angeordnet ist (Fig. 2 (4)).

[0036] Besagtes Expressionsplasmid wird in Bakterien vermehrt und nach bekannten Methoden isoliert. Nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungssequenzen die Sequenz flankieren, welche das hantelförmige Expressionskonstrukt tragen soll, werden die Restriktionsfragmente durch geeignete Methoden mit AnionenAustauschchromatographie getrennt voneinander isoliert (Fig. 2 (5)) und anschließend mit haarnadelförmig selbsthybridisierenden Oligodesoxynukleotiden (kurze, durch automatisierte chemische DNA-Synthese hergestellte DNA-Moleküle, die aufgrund ihrer Selbstkomplementarität Stamm-Schlaufenstrukturen bilden können; diese Moleküle formen später die kovalent geschlossenen Enden der hantelförmigen DNA-Moleküle) welche einen auf den durch Restriktionsverdau entstandenen Überhang des Konstruktes passenden Überhang ihrer Doppelstrangstruktur aufweisen, ligiert (Fig. 2 (6)). Nach Abtrennen der überschüssigen Haarnadel-Desoxyoligonukleotide mittels AnionenAustauschchromatographie liegen die die Erfindung ausmachenden Konstrukte vor.

1.2 Synthese aus PCR-Produkt

[0037] Alternativ wird das Konstrukt direkt mittels Polymerase-Kettenreaktion vermehrt, wobei die Primero-ligodesoxynukleotide an der 5'-Seite ihrer Sequenz Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen tragen (Fig. 2 (7)). Nach ionentausch-chromatographischem Abtrennen der Primer wird das entstandene Amplifikationsprodukt mit den Endonukleasen, für welche eine Erkennungssequenz auf den genannten Primern vorhanden war, verdaut. Nach erneutem Abtrennen der kleineren Restriktionsfragmente wird das Konstrukt mit kurzen, haarnadelförmig selbsthybridisierenden Oligodesoxynukleotiden, welche einen auf den durch Restriktionsverdau entstandenen Überhang des Konstruktes passenden Überhang ihrer Doppelstrangstruktur aufweisen, ligiert (Fig. 2 (8)). Nach Abtrennen der überschüssigen Haarnadel-desoxyoligonukleotide mittels Anionen-Austauschchromatographie liegen die die Erfindung ausmachenden Konstrukte vor.

[0038] Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für gm-csf unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-gmcsf durch vollständigen Verdau mit EcoRI und Hind III ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1290 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat.

Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTTTTCGGCCGGCCG und AGCTTGGCCGGCCGTTTTCGGCCGGCCA (TIB-Molbiol, Berlin) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt. Das mit dem Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, durch Ethanol-fällung konzentriert, in Wasser aufgenommen und nach bekannten Verfahren im ballistischen Transfer auf sterile primäre Colocar-cinom-Zellen angewendet.

Beispiel 2 [in vivo Expression]:

20 Ballistischer Transfer von gm-csf auf K562:

[0039] 30 µl einer Suspension von Goldpartikeln (1.6 µm Durchmesser, bezogen von Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Konzentration der Suspension: 30 mg/ml) werden auf eine Makrocarrier-Polymerplatte (Fa. Bio-Rad) aufpipettiert. Man wartet, bis sich das Gold abgesetzt hat, und zieht den Überstand vorsichtig ab. Auf die benetzte Fläche wird 30 µl einer 1+3 Mischung aus einer Suspension kolloidaler Magnetpartikel (mittlerer Durchmesser: 65 nm; Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland; eingesetzt, wie vom Hersteller geliefert; Konz. unbekannt) und gmcsf-Expressions-Hantelkonstrukt (siehe Bsp. 1) pipettiert. Man wirbelt das abgesetzte Gold auf und läßt das Gemisch sich absetzen. Man zieht die überstehende Flüssigkeit ab und läßt die Goldpartikel antrocknen. Auf eine Petrischale (3,5 cm) werden 300 µl Polylysin in der Mitte aufgebracht, 30 min stehen gelassen und mit PBS-Medium abgespült. Zwischen 100.000 und 200.000 Zellen (Erythroleukämiezelllinie K 562) werden in 300 µl RPMI-Medium (10% FKS) auf die polylysinbeschichtete Fläche der Petrischale gebracht und 10 min stehen gelassen. Man überschichtet mit 2 ml RPMI-Medium (10% FKS) und läßt 1-2 h im Brutschrank inkubieren.

[0040] Der ballistische Transfer wird an einer Biolistic PDS 1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach Vorschrift des Herstellers des Apparats durchgeführt. Die verwendete Berstscheibe entspricht einem Sollbruchdruck von 1.100 psi. Der Druck der Vakuumzelle beträgt 508 mm Quecksilbersäule (20 inches Hg). Magnetische Separation erfolgt wie veröffentlicht (EP 0 732 395 A1); Erfolgskontrolle erfolgt durch gm-csf-ELISA.

Beispiel 3 [Beispiel für Herstellung eines Expressionskonstruktes mit nukleärer Lokalisationssequenz]:

[0041] Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP

(Clontech) unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-egfp durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1601 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat. Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTXTCTGGCCGGCCG und AGCTTGCCGGCCGTXTCTGGCCGGCCA in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. (X bezeichnet die Peptidmodifikation: Amino-Uracil mit über X-Kopplung verbundene Peptid (TIB-Molbiol, Berlin)). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt. Das mit dem thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, durch Ethanolgefällung konzentriert und in Wasser aufgenommen. 1 µg des thiolmodifizierten Konstruktes wurde mit 1 mg Mikroprojektilen (Gold sphärisch, mittlerer Durchmesser 1 µm, Bio-Rad, Hercules, CA) in Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Goldpartikel wurden zwei Mal mit Wasser gewaschen und nach bekannten Verfahren im ballistischen Transfer auf festwachsende Keratinozyten angewendet.

Beispiel 4 [Synthese der Nukleinsäure-modifizierten GoldPartikel]:

[0042] Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für gm-csf unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-gmcsf durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1290 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat. Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTXTCTGGCCGGCCG und AGCTTGCCGGCCGTXTCTGGCCGGCCA (X bezeichnet den Thiol-Modifizier C6 S-S (TIB-Molbiol, Berlin)) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt. Das mit dem thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, in Wasser aufgenommen. 1 µg des thiolmodifizierten Konstruktes wurde mit 1 mg Mikroprojektilen (Gold sphärisch, mittlerer Durchmesser 1 µm, Bio-Rad, Hercules, CA) in Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Goldpartikel wurden zwei Mal mit Wasser gewaschen und im ballistischen

Transfer auf sterile primäre Colocarzinom-Zellen angewendet (siehe Bsp. 5).

Beispiel 5 [Ballistischer Transfer auf solides Tumorgewebe]:

[0043] Steriles primäres Colocarzinomgewebe wurde chirurgisch entnommen und auf Eis gekühlt. Nekrotische und Bindegewebeile werden, soweit möglich, entfernt. Stücke von etwa 1 cm² Oberfläche werden herausgeschnitten, in eiskaltem PBS gewaschen und auf dem Probenhalter eines Gewebeschnidders (vibratome 1000 sectioning system; TPI, St. Louis, Missouri) mit Gewebeklebstoff fixiert. Der Tumor wird in 500 µm dicke Scheiben zerschnitten. Die Scheiben werden in eiskaltem PBS gelagert und werden so schnell wie möglich transfiziert. 30 µl einer Suspension von gm-csf-Expressionskonstrukt-beschichteten Goldpartikeln und kolloidaler Magnetpartikel (mittlerer Durchmesser: 65 nm; Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach) werden auf eine Makrocarrier-Polymerplatte (Fa. Bio-Rad) aufpipettiert. Man wartet, bis sich das Gold abgesetzt hat, zieht den Überstand vorsichtig ab und läßt die Goldpartikel antrocknen. Der Vorgang des ballistischen Transfers ist mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Vorgehen identisch. Es werden beide Seiten der Scheibe beschossen. Nach der Transfektion wird die Scheibe zwei Mal durch ein Zellsieb passiert, und die Zellen werden separiert wie beschrieben.

[0044] Magnetische Separation erfolgt wie veröffentlicht (EP 0 732 395 A1); Erfolgskontrolle erfolgt durch gm-csf-ELISA.

Beispiel 6 [Synthese der Nukleinsäure-modifizierten Aluminium-Partikel]:

[0045] 5 µg des Expressionskonstruktes, welches aus der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP (Clontech) unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-egfp durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1601 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat. Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTCTCGCCGGCCG und AGCTTGCCGGCCGTCTCGCCGGCCA (Y bezeichnet das Carbonsäure-modifizierte Thymidindesoxynukleotid (TIB Molbiol, Berlin) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

[0046] 1 g Aluminiumoxidpartikel (mittlerer Durchmesser 1,0 µm) wurden in einer Lösung von Triethoxyaminopropylsilan in Toluol (2%) über Nacht am Rückfluß gekocht. Der Feststoff wird abfiltriert, mit Toluol, an-

schließlich Ethanol gewaschen, getrocknet und erneut gemahlen. 5 mg des erzeugten aminomodifizierten Aluminiumoxids werden in 100 ml wäßrigem Carbonatpuffer (pH 8,0) mit 4 µg des Carbonsäuremodifizierten Konstruktes in Anwesenheit von 50 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid und 50 mM N-Hydroxysuccinimid 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die erzeugten nukleinsäuregekoppelten Mikropartikel können durch Beschleunigung auf Zellen in einer geeigneten Apparatur, wie z.B. in der DE 195 10 696 und EP 0 732 395 A1 beschrieben, zum Eindringen in die Zellen gebracht werden, wodurch die auf dem transportierten Plasmid enthaltene Information der Zelle zugänglich gemacht wird.

Patentansprüche

1. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt zur Transkription von RNA-Molekülen, **gekennzeichnet durch** einen zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zueinander komplementären, antiparallelen Basensequenz, so daß ein hantelförmiges Konstrukt entsteht,
 - wobei der zueinander komplementäre, antiparallele Basenabschnitt im wesentlichen aus einem Promotor, einem kodierenden Bereich und entweder einem Poly(A)-Additionssignal oder einer anderen RNA-stabilisierenden Sequenz besteht,
 - und der nicht komplementäre Basenabschnitt zwei Schleifen einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure bildet, die jeweils das 5'- und 3'-Ende des komplementären, antiparallelen Basenabschnitts kovalent miteinander verbinden.
2. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** die Schleifen aus drei bis sieben Nukleotiden gebildet werden, von denen eines oder mehrere durch eine oder mehrere alkyllische Carbonsäure-, Amin-, Thiol- oder Aldehydfunktionen chemisch modifiziert sind.
3. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** mit den chemisch modifizierten Nukleotiden ein Peptid kovalent verknüpft ist, welches zum gerichteten Transport des Konstrukts in den Zellkern führt.
4. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet, daß** mit den chemisch modifizierten Nukleotiden ein Peptid kovalent verknüpft ist, welches das Verlassen des Konstrukts aus dem Endosom in das Cytosol ermöglicht.
5. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein 7-SK RNA-Promotor verwendet wird.
6. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, daß** ein CMV-Promotor verwendet wird.
7. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Interleukin-7.
8. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Interleukin-12 oder eine oder mehrere Interleukin-12-Untereinheiten.
9. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für GM-CSF.
10. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für p16 oder p53 Protein oder deren Fragmente.
11. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Aminosäuren-Fragmente aus mutierten Ki-RAS, mutiertem p53 oder bcr-abl Translokationsprodukt mit einer Sequenzlänge von 10-100 Aminosäuren.
12. Mikroprojektil zum ballistischen Transfer von Desoxyribonukleinsäurekonstrukten in Zellen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet, daß** die zu transportierende Substanz durch Adsorptionswechselwirkungen oder kovalente oder ionische Bindungen derart an das Mikroprojektil gebunden wird, daß die zu transportierende Substanz beim Durchtreten des Mikroprojektils durch Bindegewebe, die Zellen umgebende Flüssigkeit oder Zellschichten nicht oder nicht vollständig desorbiert wird, sondern an das Mikroprojektil gebunden bleibt, bis die zu transportierende Substanz mit dem Mikroprojektil in der Zielzelle zur Ruhe kommt.
13. Mikroprojektil nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Mikroprojektil aus einem der Materialien Gold, mikrokristallines Oberflächengold, Oxidkeramik, Glaskeramik oder Glas besteht und die zu transportierende Nukleinsäure über Thiol- oder Disulfidfunktion, Ester-, Amid-, Aldimin-, Ketal-, Acetal-, oder Etherbindungen kovalent mit dem Mikroprojektil verknüpft ist.
14. Mikroprojektil nach Anspruch 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet, daß** besagtes Mikroprojektil aus einem elektrisch leitfähigen Material besteht und

- die Nukleinsäure durch elektrochemische Reaktion einer mit der Nukleinsäure durch kovalente Bindung verbundenen Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Mikroprojektils als Elektrode kovalent an das Mikroprojektil gebunden wird.
15. Mikroprojektil nach Anspruch 12 bis 14, **dadurch gekennzeichnet, daß** das Mikroprojektil eine Korngröße von 0,3 bis 3,0 µm aufweist.
16. Verwendung der Desoxyribonukleinsäurekonstrukte gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 in der *ex vivo* Gentherapie.
17. Verwendung der Mikroprojektilen gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 15 in der *ex vivo* Gentherapie.
18. Verwendung der Desoxyribonukleinsäurekonstrukte gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Impfstoffes zur Behandlung von Infektionskrankheiten an Mensch und Tier.
- Claims**
1. Deoxyribonucleic acid construct for transcription of RNA-molecules, **characterized by** a circular strand of deoxyribonucleic acid comprising a partly complementary, antiparallel base sequence, so that a dumbbell-shaped construct is formed,
- in which the complementary, antiparallel base sequence in the essential comprises a promoter sequence, a coding sequence and a polyadenylation signal or another RNA-stabilizing signal,
 - and the non-complementary sequence comprises two loops of single-stranded deoxyribonucleic acid, which covalently join the 5'- and 3'- ends of the complementary, antiparallel strands.
2. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, **characterized by** that said loops consisting of three to seven nucleotides, and in which one or several of said nucleotides are covalently modified by carboxylic acid-, amine-, thiole- or aldehyde functionalities.
3. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 2, **characterized by** that said chemically modified nucleotides is being linked to a peptide leading to the directed transport of the construct into the nucleus.
4. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 2, **characterized by** that said chemically modified nucleotides is being linked to a peptide enabling liberation of the construct from the endosome.
5. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, **characterized by** using a 7SK promoter as said promoter.
6. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, **characterized by** using a CMV promoter as said promoter.
7. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims a to 6, coding for interleukine-7.
8. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for interleukine-12 or one or several of its constituting subunits.
9. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for gm-csf.
10. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for p16 or p53 protein or fragments thereof.
11. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for peptide fragments of mutated ki-ras, mutated p53 or bcr-abl translocation product with a length of between 10 and 100 amino acids.
12. Micro projectile for ballistic transfer of deoxyribonucleic acid constructs into cells according to one or several of claims 1 to 11, in which the substance to be transported is linked by adsorption or covalent or ionic binding in such a way to said micro projectile that the substance to be transported upon passage of the micro particle through connective tissue, the extra cellular liquid or cell layers is not or not completely desorbed, but remains bound to said micro projectile until the substance to be transported rests along with said micro projectile in the target cell.
13. Micro projectile according to claim 12, **characterized by** that its material being gold, micro crystalline gold, oxide ceramic, glass ceramic or glass and said nucleic acid to be transported is bound covalently by thiole- or disulfide moieties, ester-, amide-, aldimine-, ketal- or acetale- or ether functionalities to said micro projectile.
14. Micro projectile according to claim 12 or 13, **characterized by** that said micro projectile being made out of an electrically conductive material and said nucleic acid being linked to said micro projectile by electrochemically coupling of disulfide or thiole moi-

- eties, employing the micro projectile as electrode.
15. Micro projectile according to claim 12 to 14, **characterized by** that said micro projectile being of the size of 0,3 μm to 3 μm .
16. Use of a nucleic acid construct according to one or more of the claims 1 to 11 in *ex-vivo* gene therapy.
17. Use of a micro projectile according to one or more of the claims 12 to 15 in *ex-vivo* gene therapy.
18. Use of said deoxyribonucleic acid constructs according to one or several of the claims 1 to 6 for producing a vaccine for prevention of infectious disease in humans or animals.

Revendications

1. Construction d'acide désoxyribonucléique destinée à la transcription de molécules d'A.R.N., **caractérisée par** un brin circulaire d'acide désoxyribonucléique avec une séquence de bases antiparallèle partiellement complémentaire, ce qui produit une construction en forme d'haltère.
- la région antiparallèle complémentaire des bases étant constituée pour l'essentiel d'un promoteur, d'une partie codante et soit d'un signal polyadditionnel (A) soit d'une autre séquence stabilisant l'A.R.,
 - et la région non complémentaire des bases formant deux boucles d'A.D.N. à simple brin, qui établissent une liaison covalente entre les extrémités 5' et 3' de la région complémentaire et antiparallèle des bases.
2. Construction d'acide désoxyribonucléique selon la revendication n° 1, **caractérisée par le fait que** les boucles sont constituées de trois à sept nucléotides dont un ou plusieurs ont été modifiés chimiquement par une ou plusieurs fonctions aldéhyde, thiol, amine ou carboxyle alkyles.
3. Construction d'acide désoxyribonucléique selon la revendication n° 2, **caractérisée par** la liaison covalente avec les nucléotides modifiés chimiquement d'un peptide qui conduit au transport ciblé de la construction dans le noyau de la cellule.
4. Construction d'acide désoxyribonucléique selon la revendication n° 2, **caractérisée par** la liaison covalente avec les nucléotides modifiés chimiquement d'un peptide qui permet à la construction de passer de l'endosome dans le cytosol.
5. Construction d'acide désoxyribonucléique selon la

revendication n° 1, **caractérisée par** l'utilisation d'un promoteur RNA 7 SK.

6. Construction d'acide désoxyribonucléique selon la revendication n° 1, **caractérisée par** l'utilisation d'un promoteur CMV.
7. Construction d'acide désoxyribonucléique selon au moins l'une des revendications 1 à 6, codante pour l'interleukine-7.
8. Construction d'acide désoxyribonucléique selon au moins l'une des revendications 1 à 6, codante pour l'interleukine-12 ou une ou plusieurs sous-unités d'interleukine-12.
9. Construction d'acide désoxyribonucléique selon au moins l'une des revendications 1 à 6, codante pour GM-CSF.
10. Construction d'acide désoxyribonucléique selon au moins l'une des revendications 1 à 6, codante pour la protéine p16 ou p53 ou ses fragments.
11. Construction d'acide désoxyribonucléique selon au moins l'une des revendications 1 à 6, codante pour les fragments d'acides aminés de Ki-RAS mutés, de p53 mutée ou de produit de translocation bcr-abl avec une longueur de séquence de 10 à 100 acides aminés.
12. Microprojectile pour transfert balistique de constructions d'acide désoxyribonucléique dans les cellules selon une ou plusieurs des revendications 1 à 11, **caractérisé par le fait que** la substance à transporter adhère au microprojectile par interactions d'adsorption ou par liaisons covalentes ou ioniques de telle sorte que la substance à transporter ne soit pas ou pas complètement désorbée au moment de la traversée de tissu conjonctif, du liquide entourant les cellules ou des couches de cellules, mais continue d'adhérer au microprojectile, jusqu'à ce que la substance à transporter s'immobilise avec le microprojectile dans la cellule-cible.
13. Microprojectile selon la revendication n° 12, **caractérisé par le fait qu'il** se compose d'un des matériaux or, or de finition microcristallin, céramique oxydée, vitrocéramique ou verre et que l'acide nucléique à transporter est lié au microprojectile de manière covalente par une fonction thiol ou bisulfure ou bien par liaisons éther, acétal, kétal, aldimine, amide ou ester.
14. Microprojectile selon la revendication n° 12 ou 13, **caractérisé par le fait que** ledit microprojectile se compose d'un matériau électriquement conducteur et que l'acide nucléique est lié au microprojectile de

manière covalente par réaction électrochimique d'une fonction thiol ou bisulfure liée par liaison covalente à l'acide nucléique, le microprojectile étant utilisé comme électrode.

5

15. Microprojectile selon les revendications 12 à 14, **caractérisé par le fait qu'il** présente une granulation de 0,3 à 3,0 μm .

16. Utilisation dans la thérapie génique ex vivo des constructions d'acide désoxyribonucléique selon une ou plusieurs des revendications 1 à 11.

10

17. Utilisation dans la thérapie génique ex vivo des microprojectiles selon une ou plusieurs des revendications 12 à 15.

15

18. Utilisation des constructions d'acide désoxyribonucléique selon une ou plusieurs des revendications 1 à 6 pour la fabrication d'un vaccin destiné au traitement des maladies infectieuses de l'homme et de l'animal.

20

25

30

35

40

45

50

55



1

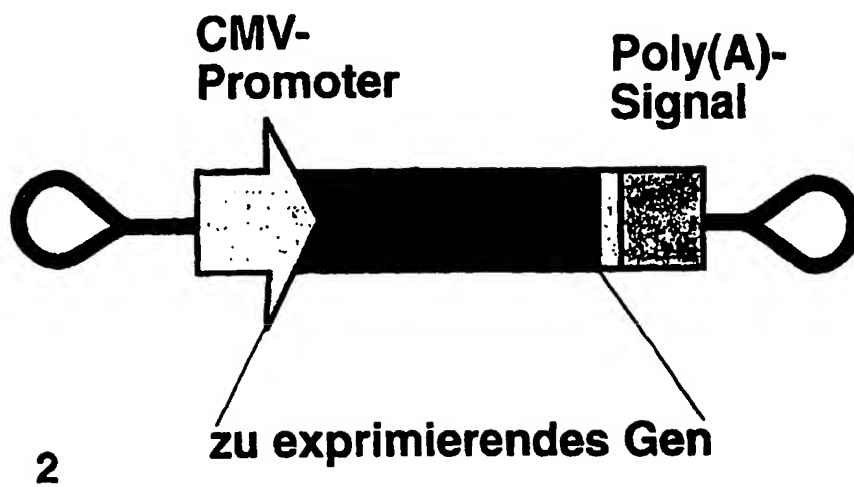


Fig. 1

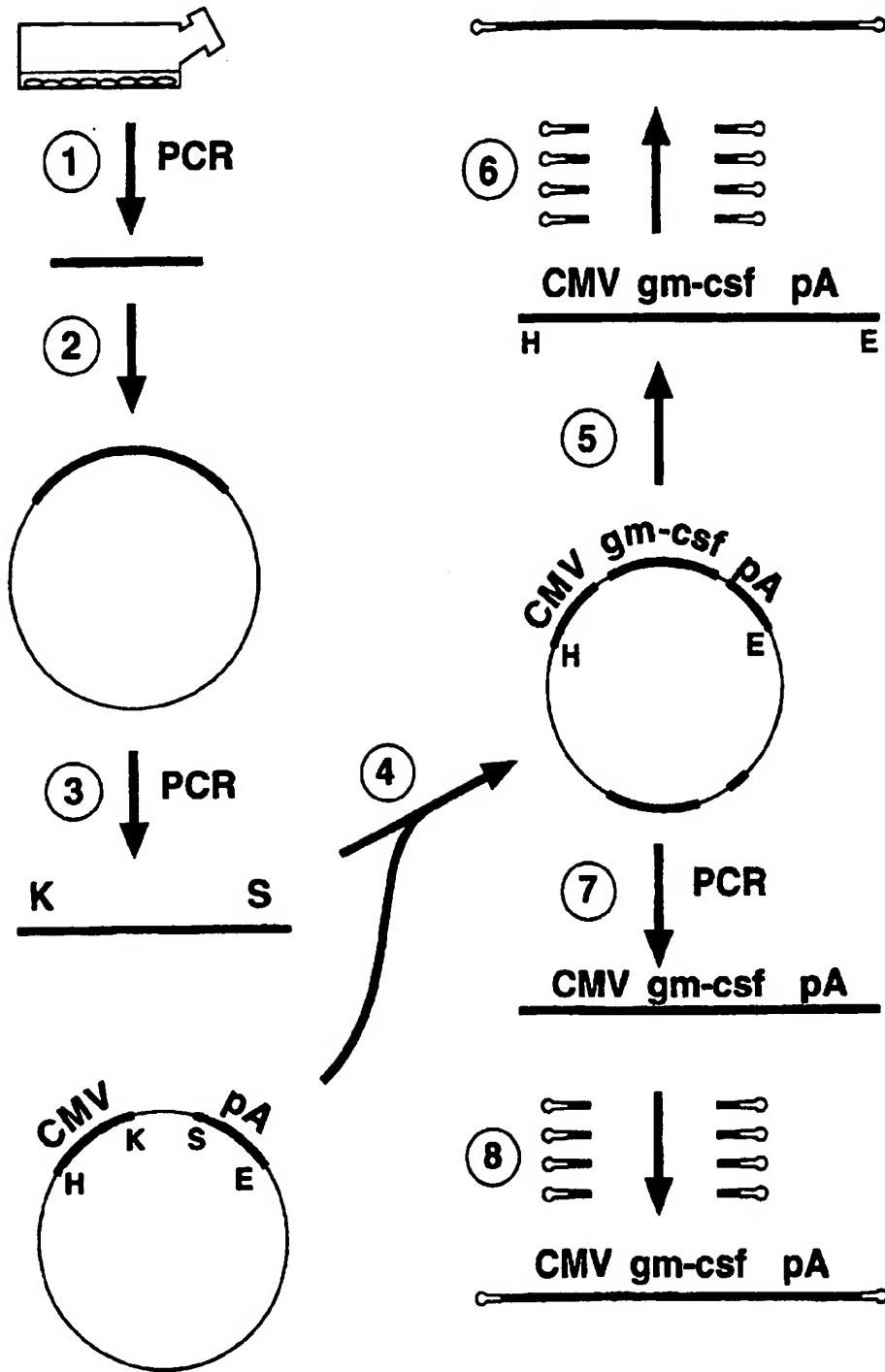


Fig. 2

AL

Dumbbell expression constructs for gene therapy

Description

The invention concerns a design principle for a minimalistic expression construct which contains no genetic information other than the information to be expressed, apart from promotor and terminator sequences which are necessary for the control of expression. Such minimal expression constructs are to be used for molecular-medical applications, specifically genetic vaccination, tumor therapy, and prophylaxis.

The design principle is to be used for the construction of expression constructs for the expression of MHC-I or MHC-II presentable peptides, cytokines, or components of the regulation of the cell cycle, or for the synthesis of regulative RNA molecules and antisense RNA, ribozyme or mRNA-editing-RNA. Furthermore, an important aspect of the invention is that the construction principle allows for the covalent linking of the expression construct, e.g. with peptides, proteins, carbohydrates or glycopeptide ligands, as well as particles which allow for the transfer of the constructs into cells by ballistic transfer especially into dermis, muscle tissue, pancreas, and the liver.

The invention is to be used especially in two related fields: somatic gene therapy and genetic vaccination. These two meet in the field of immuno gene therapy of oncological conditions. Whereas classical gene therapy intends to substitute missing or defective genes, immuno gene therapy intends to activate the immune system of the patient against tumor specific antigens. In malignant melanoma and some other tumors, a number of tumorspecific antigens have been identified which can be recognized by cytotoxic T-

lymphocytes (Van den Eynde B. and Brichard V. G., *Current Opinion in Immunology* (1995) 7: 674-681). In most cases these are fragments of mutated proteins, which are either relevant for tumor development and -promotion, or are fragments of proteins from a changed metabolism of the tumor cell

5 (Stüber et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24: 765-768). In the case of melanoma, the presented peptides often derive from proteins from the melanocyte-specific differentiation. Approaches which make use of the activation of the immune system against such tumor specific antigens are in need of methods which enable the antigenic epitopes to be overexpressed in non-

10 tumor cells, such as antigen-presenting cells (macrophages, dendritic cells). Alternatively, genes which control the expression of peptide-presenting proteins, such as CIITA or ICSBP are of great importance.

Laboratory experiments and clinical studies, in which such peptides have been used for the induction or amplification of a tumor specific cytotoxic response, concentrate on conventional vaccination protocols, in which the corresponding peptides are being used (Strominger J., *Nature Medicine*, (1995) 1:1.179-1.183). Alternatively, antigen-presenting cells such as dendritic cells, were incubated with high concentrations of such peptides. Thereby, the peptides originally present on the MHC-complex were exchanged for tumor specific peptides (Grabbe et al., *Immunology Today* (1995) 16:117-121).

15

20

The term genetic vaccination (immunization) describes the utilization of an experimental finding which first was debated as a scientific artefact, but has recently been corroborated in a number of biomedical problems (Piatak et al., *Science* 259 (1993): 1745-1749). If an expression plasmid for mammalian

25 cells is injected into skin or muscle, there is, albeit in very low efficiency, an expression of the corresponding gene close to the injection site. If the expression product is a protein alien to the organism (xenogenic or allogenic protein), uptake and presentation of fragments of the expressed protein (oligopeptide) by antigen-presenting cells (APC) takes place, probably by way of

30 local inflammation, Depending on local cytokine patterns and the type of cells

in which the plasmid is expressed (presentation by MHC-I or MHC-II), there is an induction of an immune reaction along the T_{H1} or T_{H2} pathway (Wang et al., Human Gene Therapy 6 (1995): 407-418), which eventually leads to the proliferation of cytotoxic T-cells or to the production of soluble antibodies.

- 5 The transfection of dendritic cells with expression constructs for antigenic peptides ex-vivo is included in the term genetic vaccination in this context (Schadendorf et al. Molecular Medicine Today, 2 (1996): 144-145).

Such genetic vaccination avoids the numerous risks of conventional immunization approaches. Many approaches are known in gene therapy that are
10 designed to effect therapeutic or prophylactic effects by the transfer of genetic information into cells. These approaches have not only been demonstrated in animal experiments, but also in numerous clinical studies in patients, an example being the so-called ballisto magnetic vector system (EP0686697 A2) for the transfection of conventional, plasmid-based expres-
15 sion constructs. The ballisto magnetic vector system was employed by the inventors of this application in three clinical phase I/II studies for the production of interleukin-7 (IL-7), interleukin-12 (IL-12) or granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) expressing tumor cells. In the case of expression of IL-12, separate expression constructs for the genes of the two
20 IL-12 subunits were transferred ballisto-magnetically at the same time.

With the maturing of this new discipline, however, the methodological repertoire for gene therapy demands critical inspection. A fundamental aspect of this question is the sequence information contained in conventionally employed DNA constructs. If such expression constructs are to be employed in
25 a great number of patients, and possibly more than once, safety aspects, especially those related to immunological concerns, will come to bear heavily. The conventionally used expression constructs are derivatives of eucaryotic expression plasmids. These have two fundamental disadvantages: their size, which inhibits fast transport into the cell's nucleus, and the presence of sequences which are not needed for the intended use. Expression
30

constructs used so far contain constitutively expressed genes, i.e. for resistance against cytostatica which serve as selection markers; and in some cases sequences for the episomal replication in the target cell. The expression of these genes leads to an unwanted background of transfected genetic information. Furthermore, apart from the promotor-gene-terminator structure which is to be expressed, these constructs carry at least the sequences needed for bacterial replication, since the plasmids are propagated in bacteria. These sequences are not needed for the intended use, either.

It is obvious that conventional expression constructs lead not only to the expression of the desired gene, but also to the biosynthesis of xenogenic proteins, even if their prokaryotic promoters show very low activity in mammalian cells. With longer or repeated application it can be assumed that the desired immune response is masked by such contaminating gene products, and significant immunological complications can occur.

Another problem in the application of gene therapeutic methods concerns the method by which the genetic material to be transferred is brought into the cell. For reasons of efficiency, immunological safety, and broad applicability across a wide spectrum of cell types, the method of ballistic transfer is preferred. A fundamental advantage of ballistic transfer, compared to alternative transfection methods, is that the method is applicable across a broad spectrum of different cells or tissues. Another disadvantage of methods currently used for the transfection of eukaryotic cells, such as electroporation or lipofaction, is that the treatment brings the substance to be transported only across the plasma membrane, the first barrier, which shields the cell from its environment. However, for most substances interacting with the regulative function of the cell, it is important to get from the cytoplasm across the nuclear membrane into the nucleus. This membrane is biophysically fundamentally different from the plasma membrane, and methods such as electroporation or lipofection do not lead to a passage through this membrane. The reason why these methods nonetheless lead to expression of recombinant nu-

cleic acid constructs transfected into the cells in a part of the cell population, is the fact that in the act of cell division, the nuclear membrane is rendered permeable. In consequence, methods such as electroporation or lipofaction only lead to transfection of cells which divide. Therefore these methods are not applicable to the transfection of many slowly or non-dividing cells, which can be interesting in the context of gene therapy, such as stem cells of the immune system or the hematopoietic system, muscle cells, cells of exocrine or endocrine organs and their accompanying cells. The also commonly used and very efficient transfection method of retroviral transport of genetic material suffers the great disadvantage of targeting the transfected cells for a possible cytotoxic reaction by the host organism, which probably limits the applicability of this method for gene therapeutic approaches.

The method of ballistic transfer has been used for the ex-vivo treatment of autologous and allogenic patient cells (Mahvi et.al.; Human Gene Therapy 7 (1996): 1535-43). However, when treating cells in tissue, a method which should be advantageous especially for the oncotherapeutic treatment of solid tumors or the mass prophylaxis against infections by genetic vaccination, the state of the art has disadvantages: The method of ballistic transfer makes use of DNA adsorbed to microprojectiles. When transfecting skin or other tissues, the penetration depth of the DNA constructs is lower than the penetration depth of the projectiles. DNA is desorbed soon after impact on the tissue. Only the uppermost tissue layer in the direction of the projectiles is transfected, although the projectiles themselves enter much deeper into the tissue. When transfecting solid tumor tissue (colon carcinoma, rectum carcinoma, renal-cell carcinoma and others), it has been found that, with suitable adaption of the parameters, the microprojectiles enter up to five cell layers deep into tissue slices. The transfected cells, however, (visible as fluorescent cells when transfected with a recombinant expression construct containing a green fluorescent protein from *Aequorea victoria*) were all found in the uppermost cell layer facing the impact of the microprojectiles. A more stable coupling of the DNA constructs to the surface of the microprojectiles would

be desirable in order to avoid the desorption of the substance to be transported. In this way only, the application of gene therapeutic approaches to solid tumors would be realistic, since only the transfection of tumor slices in the depth of the tissue enables a sufficient number of treated cells to be achieved. It is also imaginable that a combination of different coupling protocols enables the release of different genetic information within the same cell population at different timepoints. For these and numerous other applications, microparticles which bring the substance to be transported all the way into the hit cell and then make the substance available to the cell, would be very desirable.

US patent 5,584,807 (McCabe) describes an instrument in form of a gas pressure operated gun for the introduction of genetic material into biological tissue, in which gold particles are used as carrier material for the genetic information, without making reference to the nature of the genetic material in particular. US patents 5,580,859 and US 5,589,466 (Felgner) describe a method for the introduction of DNA into mammalian cells in the context of gene therapy. Naked DNA sequences coding for physiologically active proteins, peptides or polypeptides and are under the control of a promotor are injected directly into cells. Naked DNA refers to sequences that are free of other genetic material like viral sequences. DNA is expressed in these cells and serves as vaccine.

WO 96/26270 (Rhône-Poulenc Rorer S.A.) describes a circular double-stranded (supercoiled) DNA molecule, containing an expression cassette coding for a gene and controlled by a promoter and a terminator. This system is employed in vaccination in the context of gene therapy, also.

WO 96/32473 refers to a "dumb-bell oligonucleotide as sense inhibitors of the herpes simplex virus (HSV)". This discovery provides a description of closed, covalent dumbbell-shaped oligonucleotides which contain a linkage point for ICP4-proteins of the herpes simplex virus

EP 0 686 697 A2 (Soft Gene) concerns a method for the enrichment of cells modified by ballistic transfer, and describes the technological background, the related problems, and the solutions found so far. The basic method of ballistic transfer is described herein. A device useful for the execution of this
5 method is described in EP 0 732 395 A1.

The ballistic particles are gold particles with a diameter of either 1 μm or 1,5 μm (EP 0 686 697 A2), chosen depending upon the cell type. These gold particles are coated with superparamagnetic particles of roughly 30 nm diameter. The superparamagnetic particles at the same time furnish a useful
10 surface for the coating with biomolecules. The use of magnetic particles enables subsequent separation.

Furthermore, dumbbell-shaped nucleic acid constructs are known that are characterized by the following features: They are short (10-50 bp double-stranded DNA) nucleic acid constructs, which were made for structure re-
15 search or as double-stranded oligomers with improved nuclease resistance used for scavenging of sequence specific DNA ligands (Clusel et. al.; Nucleic Acids Res. 21 (1993): 3405-11; Lim et. al., Nucleic Acids Res. 25 (1997): 575-81).

Longer DNA molecules, which can exist throughout parts of their replication cycles as dumbbells, are known in nature as mitochondrial genomes of some species, such as ciliatae and yeasts (Dinuel et. al., Molecular and Cell Biology, 13 (1993): 2315-23). These molecules are about 50 kb in size and have a very complex genetical structure. Likewise, a closed covalent linear structure is known from vaccinia virus.
20

Peptide-nucleic acid-linkages with localization sequences are known for short DNA oligomers. Morris et al. (Nucleic Acids Res. 25 (1997): 2730-36) describe the coupling of oligomers 18-36 base pairs in length, with a 27 amino acid residues containing peptide, which contains the nuclear localization se-
25

quence from SV40 as well as a signal peptide from HIV-gp41 responsible for the fusion with CD4-positive cells.

5 The use of peptide chains for crossing the endosomal membrane has been investigated by several groups. The 23 N-terminal amino acids of haemagglutinine were adsorbed by non-covalent interactions to expression plasmids in order to facilitate the uptake of these complexes into the cytosol after endosomal uptake (Plank et.al., J.Biol.Chem. 269, 12918, (1994)). The covalent attachment of antisense desoxyoligonucleotides to haemagglutinine peptide is described by Bongartz et al. (Nuc.Acids Res. 22, 4681, 1994).

10 Based on this state of the art, it is the objective of the invention presented here to develop an expression construct that contains only the information necessary to be expressed, and to provide means for the transport into a cell, which is to be treated therapeutically.

15 This objective is reached using the features of claims 1 and 13. According to the invention, double-stranded DNA-expression constructs, which are to be transported, are modified in such fashion that both anti-parallel strands of the DNA-polymer, containing the coding sequence and the promotor and terminator sequences necessary for its expression, are linked by loops of single stranded desoxyribonucleotides at both ends in such a way, that a continuous covalently closed molecule results. Preferably, said loop contains 3 to 7 nucleotides. In figure 1, such a construct is shown schematically. Such expression constructs are employed for the expression of MHC-I or MHC-II presentable peptides, cytokines, or components of the regulation of the cell cycle, or for the synthesis of regulative RNA-molecules, such as antisense-
20 RNA, ribozymes or mRNA-editing RNA. Since the nucleic acid is covalently closed on both ends and no free hydroxyl-groups are available for nucleolytic cleavage, the molecule has a much higher stability against intra- and inter-cellular nucleases, and thus a longer halftime in the body or the cell. This
25 advantage is especially important in the application in-vivo.

Furthermore, according to the invention, said loop linking the strands can contain one or more modified bases, said bases containing chemical functions, which allow the coupling of the molecule with a solid base, preferably amino-, carboxylic acid-, thiol-, or disulfide-modifications. Said modifications
5 are covalently linked by known synthetic steps with corresponding carboxylic acid-, aldehyde-, amine-, thiole-, or other functions, or directly with a gold surface of a microprojectile for ballistic transfer. It can be imagined that a combination of different linking methods facilitates the release of a plurality of genetic information within the same cell population at different timepoints.

10 Apart from the aspect of easier chemical linking to the surface of the microprojectile, said nucleic acid construct presents another advantage: nucleic acid constructs currently used in transfection in gene therapy, are produced in bacteria and carry, besides the sequences relevant in context of their therapeutical use, other sequences, which are only needed for the amplifica-
15 tion of the nucleic acid constructs in bacteria. These sequences are an unknown risk for the patient who is to be treated, as it is not known whether and how these affect the organism. Such sequences, which not solely serve the primary objective of transfection in the target cells, can be excised from nucleic acids amplified in bacteria by restriction endonuclease digestion prior to
20 transfection, and can be substituted by covalent linkage of short ends of desoxyribonucleic acid, said ends possibly being modified. According to another aspect of the invention, DNA to be transported into the cell can be obtained by polymerase chain reaction with chemically modified primers, so that the products of the polymerase chain reaction contain the chemical modifica-
25 tions needed for binding to the micro-projectile. An advantage of the construction principle according to the invention over current expression vectors is, that the resulting constructs contain only the sequence needed for the expression of the target gene.

Another aspect of the invention is that a loop of single stranded desoxyribo-
30 nucleotides on either end of the molecules allows for the introduction of

chemical modifications in such a way that non-nucleic acid ligands can be covalently linked to the nucleic acid expression construct. This way for example, peptides needed for the nuclear localization of the expression constructs can be linked to the construct in such a way, that after entering the
5 cytosol of a cell said construct is transported by the translocation apparatus of the cell into nuclear compartments where it can be transcribed. Thereby, the constraints mentioned above concerning some transfection methods would be dealt with. Likewise the direct linking of the construct to peptides-, glycopeptide-, or carbohydrate-ligands which facilitate the entrance of the
10 construct by cell-specific surface receptors is facilitated.

Specifically, according to the invention, double-stranded anti-parallel DNA expression constructs are modified in such a way that the ends of the double strands each contain a disulfid bridge linking the strands on both ends over covalently bonded alkyl groups bound to the 5'-end of one strand and the 3'-
15 end of the other strand.

Any eucariotic promoter sequence can be employed for the control of transcription of the expression plasmid. Especially advantageous are short promoters with a high transcription rate transcribable in a multitude of cells, e.g. the "immediate early promotor" from cytomegalo virus (CMV) promoter .
20 RNA-polymerase III-depending promoters such as the 7SK-promoter or the U6-promoter are of advantage for the transcription of genes coding for RNA. Such promoter sequences can result in the expression of short antisense-RNAs, ribozymes, and artificial mRNA in vivo. RNA-polymerase III produces significantly more copies of RNA than polymerase II and has an exact termination signal, a feature of special advantage. Said promotor sequences are
25 characterized by their shortness, leading to small corresponding dumbbell expression constructs, a feature favourable to the entry of said expression constructs into the cell's nucleus.

The invention also concerns the transport of nucleic acids into cells. According to the invention, nucleic acids are transferred into cells by linking the nucleic acids to the surface of the micro-projectile carrying the nucleic acids into cells by adsorption, covalent or ionic interaction, in such a way that said nucleic acids are not or not completely desorbed upon passage of the micro-projectile through connected tissue into tissue fluid or cell layers, but remain linked to the microprojectiles until said microprojectiles come to rest with said nucleic acids in the target cells. This has the advantage that the substance is provided to a cell either in its bound state, or is desorbed in a process slow in comparison to the time of entry and is provided to the cell in a desorbed state, depending on the mode of binding.

The binding of thioles or disulfides to gold surfaces is well researched and described (G. M. Whitesides et al., Langmuir 10 (1994): 1825-1831). The nucleic acids to be transported are adsorbed preferably to micro-projectiles made of gold, however, by providing the nucleic acids with thiole or disulfide groups by covalent modification with publicly available reagents, and then adsorbed through their thiole or disulfide groups, or covalently bound to the micro-projectile by anodic oxidation of the thiole or disulfide functions employing the gold of the micro-projectile as anode. According to the invention, the substance to be transported is bound by sulfur-gold linkage or by disulfide linkage to the micro-projectile. When employing micro-projectiles made of gold, the substance to be transported is modified by molecules containing thiole groups or disulfide bridges, if it does not already contain thiole or disulfide groups able to bind by themselves. Said substance is then bound to the gold surface of the micro-projectile by chemisorption. The resulting gold-sulfur linkage is sufficiently strong to carry the molecules to be transported through several cell layers.

Since the cell contains molecules comprising thiole groups, above all the ubiquitous glutathion, an equilibrium reaction of the thiole groups on the gold surface leads to the slow desorption of the chemisorbed molecule from the

surface of the micro-projectile. Thereby, the transported substance is freely available to the cell after desorption. Furthermore, according to the invention, when employing micro-projectiles made of gold, the molecule to be transported containing thiole or disulfide bridges can be bound covalently to the
5 micro-projectile by anodic oxidation of the thiole or disulfide functions employing the gold micro-projectile as anode.

According to the invention, when employing micro-projectiles made of oxidic ceramics, glass ceramic, or glass, the molecule to be transported is bound by ester, amide, aldimine, ketal, acetal or ether linkage, or other functionalities
10 known to the organic chemist for binding of molecules to a solid surface. The numerous silane reagents used for the modification of silicon oxide phases can be employed here.

The invention is used for ex-vivo gene therapy. Preferably, interleukin-7 (IL-7) and interleukin-12 (IL-12) proteins and their subunits are expressed, as are
15 interleukines, granulocyte-makrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF), cell surface antigens and ligands of immune controlling or -modifying lymphocyte antigens like CD40, B7-1, and B7-2, proteins of the MHC-complexes I or II or β -2 microglobulin, interferone consensus sequence binding protein ICSBP, CIITA, Flt3, or entire proteins or fragments thereof of presentable
20 epitopes from tumor specific expressed mutated or non-mutated proteins, e.g. Ki-RAS-fragments, p16 and p53, or bcr-abl product. The use of micro-projectiles which are all linked with constructs of the same type is preferred, but cocktails (mixtures) of micro-projectiles which are each linked to different constructs are possible, as are micro-projectiles which are each linked with a
25 cocktail of different constructs.

The desoxyribonucleic acid construct according to the invention is preferably employed as vaccine for the treatment of infectious diseases in humans and animals, e.g. malaria and influenza.

More advantageous features are contained in the subclaims. The invention is depicted in the attached figures and is described more closely in the following examples.

5 **Figure 1** shows a schematic outline of the construction concept, whereas Fig. 1.1. shows the confirmation of the covalently closed phosphate-sugar-backbone; the number of base pairs depicted does not necessarily show the length of the constructs but only serves as example of the principle; Fig. 1.2. shows the functional structure of one of several possible expression constructs;

10

Figure 2 shows the synthesis of the constructs schematically.

Example 1 [Synthesis of the expression constructs]:

15 The fundamental construction principle is depicted schematically in Fig. 2 and is as follows:

1.1 Synthesis from vector:

The gene to be expressed, e.g. granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF), is amplified from cDNA using suitable primers by PCR (Fig. 2 (1)) and recombined into a suitable plasmid vector (Fig. 2 (2)). After sequencing and confirmation of the target sequence, the sequence to be expressed is amplified from said plasmid vector by means of two primer sequences (oligodesoxynucleotides carrying on the 5'-end of their sequence restriction enzyme recognition sites) (Fig. 2 (3)). The resulting amplification product is digested with said endonucleases, for which a recognition site was provided on said primers. After isolation of the amplified fragment from an agarose-gel,

20

25

said fragment is recombined into an expression plasmid, which is amplifiable in bacteria, and in which the gene to be expressed is located in the desired orientation in the context of the sequences controlling expression contained in said expression plasmid (Fig 2 (4)).

5 Said expression plasmid is amplified in bacteria and isolated according to methods known in the art. After digestion with restriction endonucleases, the recognition sites of which are flanking the sequence which is to be contained in the dumbbell-shaped expression constructs, the restriction fragments are separately isolated by methods of anion exchange chromatography (Fig. 2
10 (5)), and are subsequently ligated to hairpin-forming self-hybridizing oligodesoxynucleotides (short DNA-molecules obtained by automated chemical DNA synthesis, which can form stem-loop-structures based on their self-complimentarity; these molecules will later form the covalently closed ends of the dumbbell-shaped DNA-molecules), which contain an single-stranded
15 overlap compatible with the overlap of the construct obtained by the digestion with endonucleases (Fig. 2 (6)). After separation of excess hairpin desoxynucleotides by anion exchange chromatography, the constructs according to the invention are obtained.

1.2. Synthesis from PCR-product

20 Alternatively, the construct is amplified directly by polymerase chain reaction, the primer oligodesoxynucleotides carrying recognition sites for restriction endonucleases on the 5-prime ends of their sequence (Fig. 2 (7)). After separation of the primers by anion exchange chromatography, the resulting amplificate is digested with said endonucleases, for which a recognition sequence
25 was provided on said primer oligodesoxynucleotides. After separation of the smaller restriction fragments, the construct is ligated to short hairpin-formed self-hybridizing oligodesoxynucleotides, said hairpin-formed desoxynucleotides providing a overhang able to hybridize to the overhang resulting from the restriction enzyme digestion of the construct (Fig. 2 (8)). After separation

of excess hairpin-desoxyoligonucleotides by anion exchange chromatography, the constructs according to the invention are obtained.

An expression construct consisting of the sequence for gm-csf under control of the "early immediate promotor" from CMV and the polyadenylation sequence from SV40, was obtained from plasmid mtv-GM-CSF by complete digestion with EcoRI and HindIII. The smaller fragment (1290 bp) was isolated by anion exchange chromatography (stationary phase Merck fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH8; 0-1 M NaCl), and after concentration and desalting, was ligated with a 200-fold molar excess of 5' phosphorylated hairpin-desoxyribonucleotides AATTCGGCCGGCCGTTTTCGGCCGGCCG and AGCTTGGCCGGCCGTTTTCGGCCGGCCA (TIB Molbiol, Berlin) in the presence of 25 U/ml T4-DNA-ligase overnight at room temperature. The reaction was stopped by heating to 60°C. The construct ligated to the desoxyoligoribonucleotide was separated from excess desoxyoligoribonucleotide by anion exchange chromatography, concentrated by ethanol precipitation, dissolved in water and applied to sterile primary colon carcinoma cells using the ballistic transfer according to a published method.

Example 2 [*in vivo* expression]:

Ballistic transfer of GM-CSF into K562:

30 μ l of a suspension of gold particles (1.6 μ m diameter, supplied by Bio-Rad, Hercules, CA, USA, concentration of the suspension: 30 mg/ml) are transferred to a macro carrier-polymer sheet (Bio-Rad). The gold is allowed to sediment, and the supernatant is cautiously removed. Onto the wetted surface, 30 μ l of a 1+3 mixture of a suspension of colloidal magnetic particles (mean diameter 65 nm; Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany; used as supplied; concentration unknown) and GM-CSF-expression-dumbbell-construct (example 1) are pipetted. The sedimented gold is re-suspended in said mixture and allowed to re-sediment. The supernatant liquid is removed

and the gold particles are allowed to dry. 300 μ l polylysine are transferred to the center of a petri-dish (3,5 cm), allowed to rest for 30 min and washed off with PBS-medium. 100.000-200.000 cells (erytroleukemia cell line K562) are transferred onto the polylysine-coated surface of the petri-dish in 300 μ l
5 RPMI-medium (10% FCS), and allowed to rest for 10 min. 2 ml RPMI-medium (10% FCS) are added, and the cells are incubated 1-2 h in an incubator.

Ballistic transfer is conducted according to the manufacturers with a Biolystic PDS 1000/C (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The rupture disk employed corresponds to a pressure of 1100 psi. The pressure of the vacuum cell is 508 mm Hg. Magnetic separation is conducted as published (EP 0732 395A1); control of successful transfection is performed by GM-CSF-ELISA.

Example 3 [Example for synthesis of a expression-construct with nuclear localization sequence]:

15 An expression construct consisting of the gene for a green fluorescent protein under control of the early immediate promoter from CMV and the polyadenylation sequence of SV40 (pEGFP, Clontech Inc.) was obtained by restriction enzyme digestion with EcoRI and HindIII. The smaller fragment was isolated by anion exchange chromatography (stat.phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) and ligated after concentration and desalting with a 200-fold molar excess of 5'-phosphorylated hairpin-desoxyoligoribonucleotides AATTCGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCG
20 and AGCTTGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCA in the presence of 25 u/ml T4-DNA-Ligase overnight at room temperature (X signifies the peptide modification: Amino-Uracil coupled to the peptide by amide function (TIB-Molbiol, Berlin))
25 The reaction was stopped by heating to 60°C. The construct ligated to the amino-desoxy-uracil-modified desoxyoligonucleotide was separated from excess hairpin desoxynucleotides by anion exchange chromatography, concentrated by ethanol precipitation and dissolved in water. 1 μ g of the

thiol-modified construct was incubated with 1 mg micro-projectiles (spherical gold, mean diameter 1 μ m, Bio-Rad, Hercules, CA) in water over night at room temperature. The gold particles were washed twice with water and applied to adherent ceratinocytes with the ballistic transfer according to the known procedure.

Example 4 [Synthesis of nucleic-acid-modified gold particles]:

An expression construct, which consists of the sequence for gm-csf under control of the "early immediate promoter" from CMV and the polyadenylation sequence from SV40 was excised from the plasmid mtv-gmcsf by complete digest with EcoRI and HindIII. The smaller fragment (1290 bp) was isolated by anion exchange chromatography (stat. phase : Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1 M NaCl) and following concentration and desalting ligated to a 200-fold molar excess of 5'phosphorylated hairpin desoxyoligoribonucleotides AATTCGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCG and AGCTTGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCA (X specifies the thiol modifier C6 S-S (TIB-Molbiol, Berlin)) in the presence of 25 μ /ml T4 DNA Ligase and incubated over night at room temperature. The reaction was stopped by heating to 60 °C. The construct ligated to the thiol desoxyribonucleotide was separated from excess thiol modified desoxyribonucleotide by anion exchange chromatography, and resolved in water. 1 μ g of the thiol modified construt was incubated over night with 1 mg microprojectiles (shperical gold, mean diameter 1 μ m, Bio-Rad, Hercules, CA) in water. The gold particles were washed twice with water and used for ballistic transfer into sterile primary coloncarcinoma cells (see Expl. 5).

Example 5 [Ballistic transfer to solid tumor tissue]:

Sterile primary colon carcinoma tissue was removed surgically and cooled on ice. Necrotic parts and connective tissue is removed as much as possible. Pieces of ca. 1 cm² surface are excised from the tumor, washed in ice-cold

PBS and fixated on the sample holder of a tissue slicer (vibratome 1000 sectioning system; TPI, St. Louis, Missouri) with tissue glue. The tumor is sliced into slices of 500 μm thickness. The slices are stored in ice-cold PBS and transfected as soon as possible. 30 μl of a suspension of GM-CSF-expression construct-coated gold particles and colloidal magnetic particles (mean diameter: 65 nm – Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach) are pipeted onto a macro carrier polymer sheet (Bio-Rad). The gold is allowed to sediment, the supernatant removed and the gold particles are allowed to dry. The procedure of ballistic transfer is identical with the procedure described in example 2. Both sides of the tumor slice are transfected. After transfection, the slice is passed twice through a cell sieve, and the cells are separated as described.

Magnetic separation is performed according to the published protocol (EP 0 732 395 A1); the success of the transfection is controlled by GM-CSF-ELISA.

15 Example 6 [Synthesis of nucleic acid-modified aluminum particles]:

5 μg of an expression construct consisting of the gene for a green fluorescent protein under control of the early immediate promoter from CMV and the polyadenylation sequence of SV40 (pEGFP, Clontech Inc.) was obtained by restriction enzyme digestion with EcoRI and HindIII. The smaller fragment was isolated by anion exchange chromatography (stat.phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) and ligated after concentration and desalting with a 200-fold molar excess of 5'-phosphorylated hairpin-desoxyoligoribonucleotides AATCGGCCGCGCCGTYTCGGCCGCGCCG and AGCTTGGCCGCGCCGTYTCGGCCGGCCA (Y signifies the carboxylic acid modified thymidinedesoxynucleotide (TIB-Molbiol, Berlin)) in the presence of 25 U/ml T4-DNA-Ligase overnight at room temperature

1g aluminiumoxyde particles (mean diameter 1,0 μm) were refluxed in a solution of tri-etoaminopropylsilane in toluene (2%) overnight. The solid matter is

filtrated, washed with toluene and ethanol, dried and ground. 5 mg of the resulting amino-modified aluminiumoxyde are reacted in 100 ml aqueous carbonate buffer (pH 8,0) with 4 μ g of the carbonic-acid-modified construct in the presence of 50 μ M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and
5 50 mM N-hydroxysuccinimide for 2 h at room temperature. The resulting nucleic-acid modified microparticles can be transported to cells by acceleration in a suitable apparatus, as described in DE 195 10 696 and EP 0 732 395 A1, whereby the information contained in the transported constructs is made available to the cells.

Claims

)

)

1. Deoxyribonucleic acid construct for transcription of RNA-molecules, characterized by a circular strand of deoxyribonucleic acid comprising a partly complementary, antiparallel base sequence, so that a dumbbell-shaped construct is formed,
 - 5 - in which the complementary, antiparallel base sequence in the essential comprises a promotor sequence, a coding sequence and a polyadenylation signal or another RNA-stabilizing signal,
 - and the non-complementary sequence comprises two loops of single-stranded deoxyribonucleic acid, which covalently join the 5'- and 3'-
10 ends of the complementary, antiparallel strands.
2. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, characterized by that said loops consisting of three to seven nucleotides, and in which one or several of said nucleotides are covalently modified by carboxylic acid-, amine-, thiole- or aldehyde functionalities.
- 15 3. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 2, characterized by that said chemically modified nucleotides is being linked to a peptide leading to the directed transport of the construct into the nucleus.
4. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 2, characterized by that said chemically modified nucleotides is being linked to a peptide enabling liberation of the construct from the endosome.
20
5. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, characterized by using a 7SK promoter as said promoter.
6. Deoxyribonucleic acid construct according to claim 1, characterized by using a CMV promoter as said promoter.

7. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims a to 6, coding for interleukine-7.
8. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for interleukine-12 or one or several of its constituting sub-
5 units.
9. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for gm-csf.
10. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for p16 or p53 protein or fragments thereof.
- 10 11. Deoxyribonucleic acid construct according to at least one of the claims 1 to 6, coding for peptide fragments of mutated ki-ras, mutated p53 or bcr-abl translocation product with a length of between 10 and 100 amino acids.
12. Micro projectile for ballistic transfer of deoxyribonucleic acid constructs
15 into cells according to one or several of claims 1 to 11, in which the substance to be transported is linked by adsorption or covalent or ionic binding in such a way to said micro projectile that the substance to be transported upon passage of the micro particle through connective tissue, the extra cellular liquid or cell layers is not or not completely desorbed, but
20 remains bound to said micro projectile until the substance to be transported rests along with said micro projectile in the target cell.
13. Micro projectile according to claim 12, characterized by that its material being gold, micro crystalline gold, oxide ceramic, glass ceramic or glass and said nucleic acid to be transported is bound covalently by thiole- or
25 disulfide moieties, ester-, amide-, aldimine-, ketale- or acetale- or ether functionalities to said micro projectile.

14. Micro projectile according to claim 12 or 13, characterized by that said micro projectile being made out of an electrically conductive material and said nucleic acid being linked to said micro projectile by electrochemically coupling of disulfide or thiole moieties, employing the micro projectile as electrode.
15. Micro projectile according to claim 12 to 14, characterized by that said micro projectile being of the size of $0,3\ \mu\text{m}$ to $3\ \mu\text{m}$.
16. Use of a nucleic acid construct according to one or more of the claims 1 to 11 in *ex-vivo* gene therapy.
17. Use of a micro projectile according to one or more of the claims 12 to 15 in *ex-vivo* gene therapy.
18. Use of said deoxyribonucleic acid constructs according to one or several of the claims 1 to 6 for producing a vaccine for prevention of infectious disease in humans or animals.